



## Cambios en el contenido de mioglobina en el músculo porcino *Longissimus thoracis* durante el almacenamiento en congelación



Jonathan Coria-Hernández <sup>a\*</sup>

Rosalía Meléndez-Pérez <sup>a</sup>

Abraham Méndez-Albores <sup>a</sup>

José Luis Arjona-Román <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Unidad de Investigación Multidisciplinaria. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan km 2.5, 54740, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

\*Autor de correspondencia: [jonathancoria@outlook.com](mailto:jonathancoria@outlook.com)

### Resumen:

En este estudio se utilizó el músculo porcino *Longissimus thoracis*, el cual se congeló en una cámara y descongeló bajo condiciones controladas. Se evaluó el perfil de color y la mioglobina superficial. Se realizó un análisis térmico mediante calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC) y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR). Se observaron efectos importantes en la mioglobina debido al proceso de congelación-descongelación en parámetros como el pH, la luminosidad ( $L^*$ ) y el índice de saturación, así como las energías de activación ( $E_a$ ) y entalpía ( $\Delta H$ ) de desnaturalización entre las formas de mioglobina. En la carne cruda se encontró una mayor proporción de desoximioglobina y en las muestras congeladas-descongeladas la metamioglobina era la forma más abundante, lo que indica que hay efectos significativos que se correlacionan con los cambios en las coordenadas triestímulo y con los parámetros térmicos y químicos en la carne de cerdo.

**Palabras clave:** Mioglobina, Congelación-descongelación, Carne de cerdo, MDSC, Perfil de color, FTIR, Espectroscopia.

Recibido: 10/01/2019

Aceptado: 24/07/2019

## Introducción

Debido a su composición química, la carne es un producto altamente susceptible a la degradación provocada por diversos factores, como la temperatura de almacenamiento (enfriamiento y congelación), las atmósferas modificadas y los microorganismos. Generalmente, la carne de cerdo se consume como un platillo principal o en varios subproductos como embutidos madurados y cocidos. Sin embargo, se busca prolongar su vida útil al aplicar técnicas de conservación que no alteren sus propiedades, principalmente la sensorial, que es la más importante para los consumidores<sup>(1-3)</sup>. Con el aumento del consumo de carne en México y su comercialización en lugares como Asia, Europa y Sudamérica, el almacenamiento en congelación en cámaras frigoríficas ha sido el método más utilizado, ya que, entre otros factores, es económico, controla el crecimiento microbiano e inhibe las reacciones enzimáticas y el deterioro químico. El método y la velocidad de congelación son determinantes para la formación de los cristales de hielo (tamaño y geometría); sin embargo, un mal manejo del proceso puede dañar las fibras musculares o desencadenar importantes reacciones bioquímicas como proteólisis y oxidación lipídica. Esta última puede afectar de forma irreversible las propiedades fisicoquímicas y funcionales de ciertas proteínas como las miofibrilares, sarcoplásmicas y conectivas<sup>(4-6)</sup>.

La mioglobina es la principal proteína responsable del color de la carne; pertenece al grupo de las proteínas sarcoplásmicas, solubles en agua. La mioglobina consiste en una cadena polipeptídica (8 hélices alfa), llamada globina, y un grupo prostético *hemo* con un átomo de hierro en el centro. Su peso molecular varía de 14 a 18 kDa. El color de la carne está influenciado por el contenido de pigmento y por la forma química y estructura de la mioglobina. Uno de los factores que determina el color de la carne es el estado de oxidación del hierro y los compuestos (oxígeno, agua u óxido nítrico) unidos a la molécula. La termoestabilidad de esta proteína también depende del estado químico, la desoximioglobina (DMb) es la forma más estable frente a la desnaturalización por calor, seguida de la oximioglobina (OMb) y la metamioglobina (MMb). Por lo tanto, la termodinámica de las reacciones de transformación entre la DMb, OMb y MMb es bastante similar, con la excepción de la transformación de OMb a MMb<sup>(7)</sup>.

Este trabajo buscó evaluar los cambios que ocurren en el estado de oxidación de la mioglobina en el músculo porcino durante el almacenamiento en congelación, y sus efectos

en diversos aspectos oxidativos que pudieran afectar las características sensoriales y de calidad del sistema, como el perfil de color y la estabilidad térmica de las diferentes formas químicas de la mioglobina.

## Material y métodos

### Preparación de las muestras

El músculo *Longissimus thoracis* se obtuvo de cerdos macho castrados de la raza Pietrain (6 meses de edad) con un peso aproximado de  $110 \pm 2$  kg. Los cerdos se alojaron en un corral ( $4.9 \times 2.0$  m) con piso de cemento y una canaleta de 0.5 m de ancho en la zona de excretas. Se les ofreció agua y alimento *ad libitum*. Nutrición Técnica Animal S.A. de C.V. fabricó los alimentos utilizados (Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México). No se adicionaron antibióticos u otros agentes promotores del crecimiento a las dietas. Se obtuvieron cinco piezas de músculo de la sección de la 9<sup>a</sup> y 13<sup>a</sup> costilla, los cortes de  $1 \text{ cm}^3$  se refrigeraron durante 24 h después del *rigor mortis*. Subsecuentemente, las muestras se sellaron al vacío empleando películas flexibles de polietileno de baja densidad y se congelaron en una cámara (REVCO Ultima II, New Castle DE, EE. UU.) a  $-18 \pm 2$  °C durante 24 h, después se descongelaron a  $4 \pm 2$  °C durante 5 h en una cámara común (Nieto, México) con una humedad relativa del 70 %. Todos los experimentos se realizaron en la UNAM-FES Cuautitlán, en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria L13 (Análisis térmico y estructural de materiales y alimentos).

La extracción de la mioglobina se realizó siguiendo la metodología propuesta por Warris<sup>(8)</sup>. Brevemente, se homogeneizaron 5 g de carne durante 1 min en una solución 40 mM de fosfato de potasio (pH=6.8) a 2 °C; posteriormente, los homogenizados se centrifugaron a  $50,000 \times g$  durante 30 min a 5 °C en una centrífuga K3 (Centurion Scientific, Reino Unido), el sobrenadante se filtró a través de un papel filtro Whatman núm. 1.

### Análisis químico

El análisis químico se realizó conforme a los métodos propuestos por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales<sup>(9)</sup>: contenido de humedad (986.21), cenizas totales (990.08), lípidos (960.39) y proteínas (977.14). El pH se determinó empleando la metodología descrita

por Koniecko<sup>(10)</sup>, empleando un medidor de pH (HI99163, Hanna Instruments, RI, EE. UU.). En todos los casos se realizaron cinco repeticiones,

### Perfil de color

Se utilizó la metodología descrita por la American Meat Science Association (Asociación Americana de Ciencia de la Carne)<sup>(4)</sup> empleando un espectrofotómetro de reflectancia CM600d (Konica Minolta, Tokio, Japón). Las condiciones de medición fueron: iluminante acoplado tipo A (incandescente con filamento de tungsteno a 2856 K), apertura de 8 mm y un ángulo de observación de 10°. Los valores triestímulo ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) se obtuvieron de conformidad con el sistema CieLab empleando el software Spectra Magic NX™. Los fenómenos de reflectancia y absorbancia se evaluaron en el intervalo de longitud de onda de 400 a 700 nm. A partir de los datos se calculó el ángulo de tonalidad (°tonalidad), el índice de saturación ( $C^*$ ) y la diferencia de color total ( $\Delta E^*$ )<sup>(11-14)</sup>.

### Fracción de mioglobina superficial

La fracción de mioglobina se cuantificó en la superficie de la carne (perpendicular a las fibras), conforme a las recomendaciones de Tang *et al*<sup>(15)</sup>. Se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$\text{Desoximioglobina} = -0.543R_1 + 1.594R_2 + 0.552R_3 - 1.329 \quad (\text{ec. 1})$$

$$\text{Oximioglobina} = 0.722R_1 - 1.432R_2 - 1.659R_3 + 2.599 \quad (\text{ec. 2})$$

$$\text{Metamioglobina} = -0.159R_1 - 0.085R_2 + 1.262R_3 - 0.520 \quad (\text{ec. 3})$$

$$R_1 = \frac{A_{582}}{A_{525}} \quad (\text{ec. 4})$$

$$R_2 = \frac{A_{557}}{A_{525}} \quad (\text{ec. 5})$$

$$R_3 = \frac{A_{503}}{A_{525}} \quad (\text{ec. 6})$$

## Análisis térmico

Las muestras se analizaron con un calorímetro diferencial de barrido de temperatura modulada (DSC 2920, TA Instruments, New Castle DE, EE. UU.). El enfriamiento se llevó a cabo utilizando un sistema de enfriamiento. La calibración de la temperatura y la capacidad de calorífica se realizó utilizando el software de TA Instruments con indio (punto de fusión de 156.6 °C) y zafiro (óxido de aluminio), respectivamente. El software de análisis universal de TA Instruments (2000V 4.5A) se utilizó para registrar y analizar todos los termogramas. Las muestras ( $12 \pm 0.53$  mg) se envasaron en recipientes herméticos de aluminio y se analizaron por triplicado al calentar en el DSC modulado a una velocidad de 5 °C/min con una temperatura modulada de 0.8 °C cada 60 s. Se utilizó nitrógeno como gas de purga a una velocidad de flujo constante de 60 ml/min. Los datos de descomposición térmica se colectaron a lo largo de un intervalo de temperatura de 20 a 90 °C<sup>(6,16-18)</sup>.

## Energías de activación ( $E_a$ )

La  $E_a$  requerida para la desnaturalización proteica se obtuvo empleando la metodología descrita por Coria *et al*<sup>(11)</sup>, Calzetta y Suarez<sup>(19)</sup> y Cornillion<sup>(20)</sup>. También se determinó el orden de reacción ( $n$ ), la constante de Arrhenius ( $Z$ ), el grado de conversión ( $\alpha$ ) y la tasa de conversión ( $d\alpha/dt$ ) empleando las siguientes ecuaciones:

$$\ln\left(\frac{d\alpha}{dt}\right) = \ln Z - n \ln(1 - \alpha) - \frac{E_a}{RT} \quad (\text{ec. 7})$$

$$\alpha = \frac{\Delta H_g}{\Delta H_t} \quad (\text{ec. 8})$$

Donde  $\Delta H_g$  es la entalpía para cada temperatura en la zona de transición ( $\text{J g}^{-1}$ ), y  $\Delta H_t$  es la entalpía total ( $\text{J g}^{-1}$ ). Para obtener el valor de los factores desconocidos ( $Z$ ,  $n$  y  $E_a$ ) se realizó un análisis de regresión lineal múltiple (RLM) de la ec. 7.

## Espectroscopia FTIR-ATR

Los grupos funcionales en la carne se caracterizaron con el espectrofotómetro Frontier SP8000 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones de Coria *et al*<sup>(21)</sup>. Brevemente, las muestras se colocaron encima del cristal de reflectancia total atenuada (ATR), los espectros se colectaron en el intervalo de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  a una resolución de 4

cm<sup>-1</sup> al coadicionar 32 barridos. Se obtuvo un espectro de fondo contra el aire todos los días durante el experimento.

## Análisis estadístico

El experimento se realizó como un diseño completamente aleatorizado (la unidad experimental consistió en 25 cubos de 1 cm<sup>3</sup> tomados aleatoriamente de cinco músculos *Longissimus thoracis*). Los datos experimentales se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías, las medias se separaron con la prueba de Tukey. Se utilizó una probabilidad  $P < 0.05$  para distinguir diferencias significativas empleando el software Minitab 16.0.1 (Penn State University, Pensilvania, EE. UU.). Para el análisis de regresión lineal múltiple se utilizó el software Origin Pro 8 (OriginLab Corp., Northampton, MA, EE. UU.).

## Resultados y discusión

### Análisis químico

La composición química de la carne cruda y descongelada se muestra en el Cuadro 1. Los resultados son similares a los reportados por Meléndez *et al*<sup>(6)</sup> y Karamucki *et al*<sup>(22)</sup>. Se observan diferencias significativas en el contenido de humedad ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos. El proceso de congelación ocasiona la formación de largos cristales que rompen las fibras de carne; por lo que, en estas muestras se perdió cierta cantidad de agua por exudación. Además, la pérdida de agua en las muestras descongeladas también ejerció un efecto importante en la disminución del contenido de cenizas, pero no en el de proteínas o lípidos, como reportaron anteriormente Karamucki *et al*<sup>(22)</sup>.

**Cuadro 1:** Composición química de la carne cruda y descongelada

Componente	Cruda	Descongelada
Humedad	75.30±1.19 <sup>a</sup>	74.86±0.46 <sup>b</sup>
Proteínas	21.83±2.54 <sup>a</sup>	22.64±1.12 <sup>a</sup>
Lípidos	1.87±0.09 <sup>a</sup>	1.96±0.20 <sup>a</sup>
Cenizas	1.0±0.03 <sup>a</sup>	0.54±0.11 <sup>b</sup>

Media ± desviación estándar

<sup>ab</sup> Las medias con diferente letra en la misma fila son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

## pH

Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el valor de pH de la carne congelada-descongelada en comparación con la carne cruda, con valores de  $5.69 \pm 0.08$  y  $5.63 \pm 0.17$ , respectivamente. Por lo tanto, se confirmó que este proceso de conservación produce cambios importantes; entre ellos, las modificaciones en la dinámica redox de la mioglobina debido a una disminución en la formación de ácido láctico a partir del glucógeno muscular por glucogenólisis anaerobia<sup>(23)</sup>. Esto genera diversas interconversiones, las cuales alteran la estructura de la carne y, por lo tanto, ocurren cambios importantes en la apreciación del color; esto conlleva a defectos en la calidad y resulta en la formación de carne PSE (pálida, suave y exudativa) o DFD (oscura, firme y seca)<sup>(24)</sup>. Según Krzywicki<sup>(25)</sup>, la disminución de los valores de pH está generalmente acompañada por una disminución en la profundidad de penetración de la luz y un aumento de la reflectancia, lo que genera un aumento en la luminosidad ( $L^*$ ) y una disminución en la cantidad de la forma reducida de la mioglobina (DMb). Al mismo tiempo, los valores más bajos de pH también están relacionados con una mayor susceptibilidad de los pigmentos musculares a la oxigenación y oxidación y, en consecuencia, la formación de mayores cantidades de OMb y MMb.

## Perfil de color

Las medias de los parámetros del perfil de color se muestran en el Cuadro 2. Para la carne cruda, los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  son similares a los reportados en otros estudios<sup>(26-30)</sup>. En general, el proceso de congelación-descongelación genera cambios significativos en la coordenada de luminosidad ( $L^*$ ). Los cristales de hielo intra- y extracelulares tienen un ángulo molecular de  $109.45^\circ$  entre los átomos de hidrógeno<sup>(31,32)</sup>; este ángulo fue diferente al que se observa en el agua líquida ( $104.50^\circ$ ), lo que genera rupturas en las fibras de carne y algunos enlaces, permitiendo así la salida de exudados. Además, el valor de  $L^*$  depende de la cantidad total de luz absorbida y reflejada por la superficie de la carne. Por lo tanto, el impacto de la absorción y reflectancia en la apreciación de la luminosidad del color varía dependiendo del contenido de pigmento en el tejido y su estructura. Es bien conocido que el contenido relativo de la forma química de la mioglobina en la superficie de la carne también influye la coordenada  $L^*$ <sup>(22)</sup>. La coordenada  $a^*$  generalmente se correlaciona con una coloración rojiza. En esta investigación, el valor promedio de  $a^*$  fue ligeramente más alto en la carne descongelada, lo que se atribuye al hecho de que la mioglobina superficial sufrió modificaciones cuando las reacciones redox ocurrieron por efectos del tiempo en los procesos de congelación-descongelación. Se observó el mismo fenómeno en la coordenada  $b^*$ . Según Lesiów y Xiong<sup>(27)</sup> y Skrlep y Candek-Potokar<sup>(30)</sup>, el ángulo de la tonalidad para la carne

color rosa o rojo debe estar dentro del intervalo de 0 y 90°. En esta investigación, el proceso de congelación-descongelación afecta de forma significativa la tonalidad de la carne. Los valores obtenidos del índice de saturación ( $C^*$ ) coinciden con los reportados por otros investigadores<sup>(23,30)</sup>. Las diferencias en el índice de saturación fueron estadísticamente significativas, lo que indica que los cambios en la saturación del color son imperceptibles. La diferencia de color total ( $\Delta E^*$ ) entre la carne cruda y la congelada-descongelada tiene un valor promedio de  $3.63 \pm 0.68$ , lo que indica que el proceso de cristalización-fusión genera cambios en las tres coordenadas del perfil de color. Sin embargo, según la AMSA<sup>(4)</sup> y Chmiel *et al*<sup>(33)</sup>, hasta 5 unidades en la diferencia de color total no eran perceptibles para el ojo humano.

**Cuadro 2:** Parámetros del perfil de color en el sistema CieLab de la carne cruda y descongelada

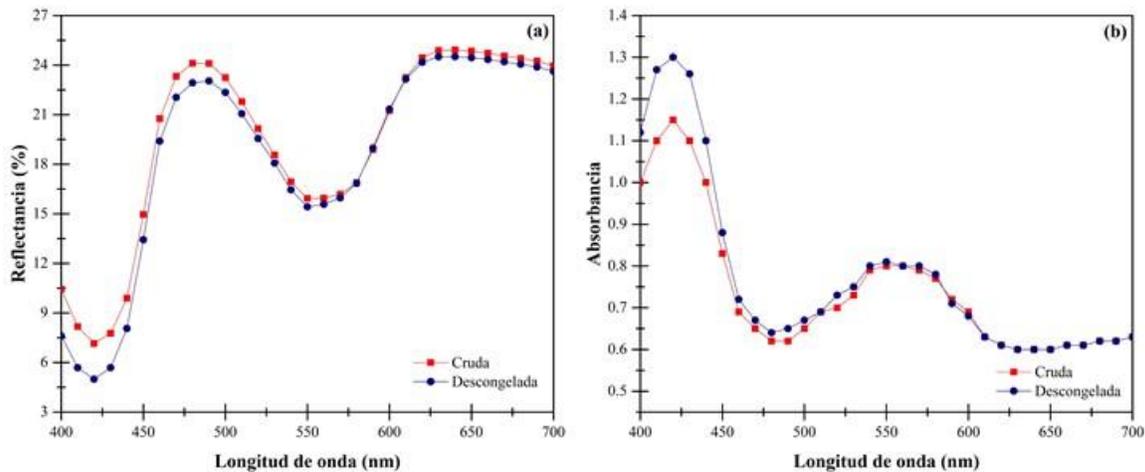
Muestra	$L^*$	$a^*$	$b^*$	Ángulo de tonalidad	$C^*$
Cruda	$51.30 \pm 0.48^a$	$4.98 \pm 1.14^a$	$5.23 \pm 1.03^a$	$46.38 \pm 3.51^a$	$7.22 \pm 1.48^a$
Descongelada	$50.91 \pm 1.75^b$	$5.39 \pm 0.90^b$	$7.91 \pm 0.94^b$	$55.76 \pm 5.20^b$	$9.57 \pm 0.98^b$

Media  $\pm$  desviación estándar.

<sup>ab</sup> Las medias con diferente letra en la misma columna son diferentes ( $P < 0.05$ ).

La Figura 1-a muestra el espectro de reflectancia de la carne cruda y descongelada, la banda característica entre 500 y 600 nm corresponde a la mioglobina en su estado no oxidado<sup>(4)</sup>. También es importante resaltar que las diferencias entre las muestras fueron significativas ( $P < 0.05$ ). Las muestras descongeladas presentaron cierta cantidad de líquidos exudados, lo que generó valores de reflectancia ligeramente inferiores. La luz juega un papel importante en la apreciación del color, ya que el fenómeno de palidez en la carne PSE se puede explicar por la contracción de las miofibrillas debido a bajos valores de pH, lo que aumenta la diferencia del índice de refracción y la reflectancia en la superficie de la carne<sup>(34)</sup>, contrario a la carne congelada-descongelada. Existen varias teorías que establecen que la palidez se origina principalmente por la desnaturalización en frío y la precipitación de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas<sup>(6)</sup>. Aunado a esto, la mioglobina en la carne PSE de cerdo es muy susceptible a la desnaturalización en frío, lo que genera un pequeño cambio en la estructura helicoidal, modificando sus propiedades ópticas.

**Figura 1:** Espectros de la carne cruda y descongelada, curvas de (a) reflectancia, (b) absorbancia



### Fracción de mioglobina superficial

Los espectros de absorbancia también se muestran en la Figura 1-b. En general, las muestras que presentan daño estructural debido a los procesos de congelación-descongelación muestran fuertes bandas de absorción. Este fenómeno fue posible debido a las rupturas de las fibras por la cristalización del agua. Este efecto genera diferencias en la superficie, lo que se refleja en cambios en los parámetros del perfil de color y la apreciación visual<sup>(4)</sup>. Comúnmente, la absorbancia de la mioglobina en sus diferentes formas es de 503, 525, 557 y 582 nm.

Conforme a los valores que se presentan en el Cuadro 3, en la carne cruda, la mayor cantidad de mioglobina se encontró en la forma de DMb, no se observaron alteraciones en su estructura. El proceso de enfriamiento de la carne después de la matanza tuvo efectos significativos que modifican la estructura de la proteína sarcoplásmica. En las muestras congeladas-descongeladas, la mioglobina se encontraba principalmente en su forma reducida MMb. El tratamiento calorífico y el contacto con la atmósfera aumentaron el valor del pH, lo que causó diferencias entre las muestras<sup>(34)</sup>. Según Cho y Choy<sup>(35)</sup>, la estabilidad conformacional de la molécula de mioglobina está fuertemente afectada por la unión del grupo *hemo* a la cadena polipeptídica. Los autores sugieren que la estructura del átomo de hierro es el principal factor que afecta la estabilidad de esta proteína en particular.

**Cuadro 3:** Fracción de las moléculas de mioglobina en la carne de cerdo

	<b>Cruda</b>	<b>Descongelada</b>
Desoximioglobina	0.3884±0.0023 <sup>a</sup>	0.3429±0.0006 <sup>b</sup>
Oximioglobina	0.2282±0.0021 <sup>a</sup>	0.2769±0.0018 <sup>b</sup>
Metamioglobina	0.3843±0.0019 <sup>a</sup>	0.3760±0.0012 <sup>b</sup>

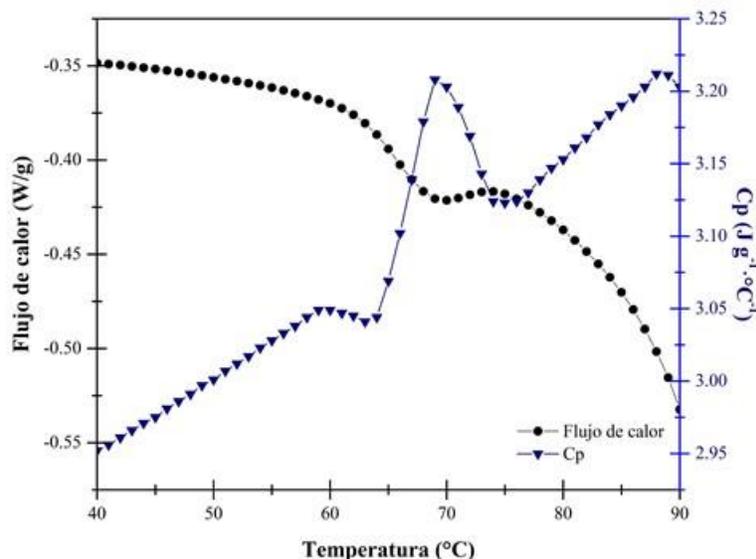
Media ± desviación estándar

<sup>ab</sup> Las medias con diferente letra en la misma fila son diferentes ( $P<0.05$ ).

En el intervalo de pH de la carne después de la matanza ocurrieron cambios en el índice de refracción miofibrilar; en consecuencia, la reflectancia aumentó y disminuyó. Conforme disminuye el pH, la absorbancia cambia de forma inversamente proporcional a la reflectancia. La fuerte birrefringencia intrínseca de las miofibrillas no contribuye necesariamente a la reflectancia y absorbancia, pero este fenómeno depende directamente de la cantidad de agua en la superficie y el estatus químico de la molécula de mioglobina<sup>(34,35)</sup>.

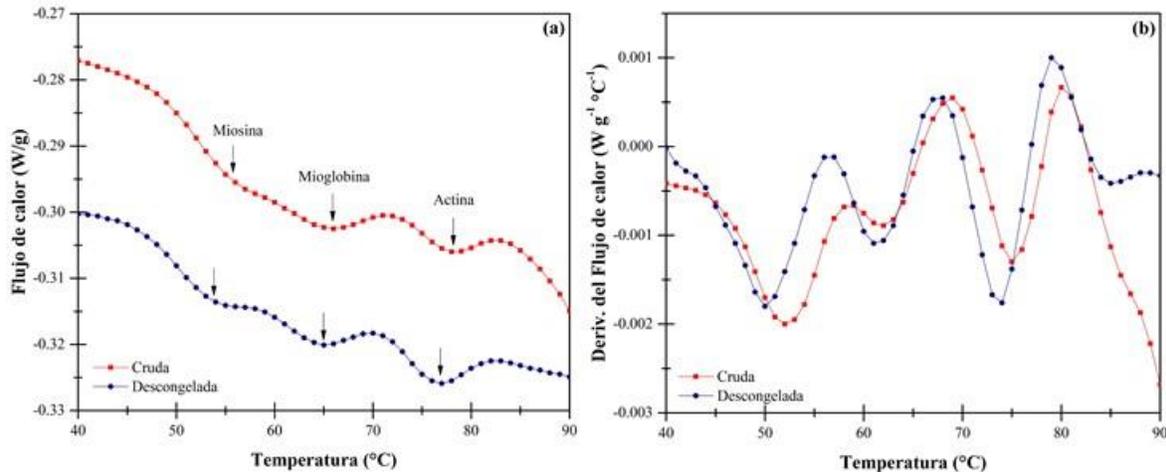
### Análisis térmico por MDSC

Se ha reportado que la temperatura de desnaturalización de la mioglobina está entre los 60 y 70 °C<sup>(35-38)</sup>. La Figura 2 presenta el termograma del flujo de calor y el calor específico ( $C_p$ ) para el extracto de mioglobina. La transición observada se presentó a una temperatura inicial ( $T_0$ ) de 63.51 °C, la temperatura de desnaturalización ( $T_p$ ) fue 68.58 °C con una entalpía ( $\Delta H$ ) de 1.334 J g<sup>-1</sup>. Se observaron cambios importantes en los valores de  $C_p$ , lo que indica que el proceso modifica de forma significativa la estructura de la proteína.

**Figura 2:** Flujo de calor y calor específico ( $C_p$ ) del extracto de mioglobina

En el caso de la carne cruda y congelada-descongelada, el termograma del flujo de calor (Figura 3-a) muestra las transiciones principales de las proteínas. Se observaron diferencias significativas entre los valores de flujo de calor. Estas endotermas están asociadas sin excepción a los fenómenos de desnaturalización de proteínas (miosina, actina y mioglobina)<sup>(6,17,39,40)</sup>.

**Figura 3:** (a) Flujo de calor, (b) Flujo de calor derivado como una función de la temperatura de la carne cruda y descongelada



En la gráfica de la derivada del flujo de calor (Figura 3-b) no ocurrieron cambios significativos, por lo que, se observaron únicamente efectos de desnaturalización de la miosina, actina y proteínas sarcoplásmicas. Los valores de  $T_0$ ,  $T_p$  y  $\Delta H$  de cada transición se resumen en el Cuadro 4. En general, el valor de  $T_0$  de la carne descongelada fue menor que el de la carne cruda. El valor de  $\Delta H$  para la desnaturalización proteica fue significativamente diferente ( $P < 0.05$ ) entre las muestras de carne cruda y congelada-descongelada. La mioglobina, en su estructura nativa, no se vio afectada por el proceso de congelación-descongelación, pero las pequeñas diferencias en las temperaturas de transición y las entalpías de desnaturalización podrían ser el resultado de la transformación química de la DMb en la carne cruda a la MMb en la carne congelada-descongelada.

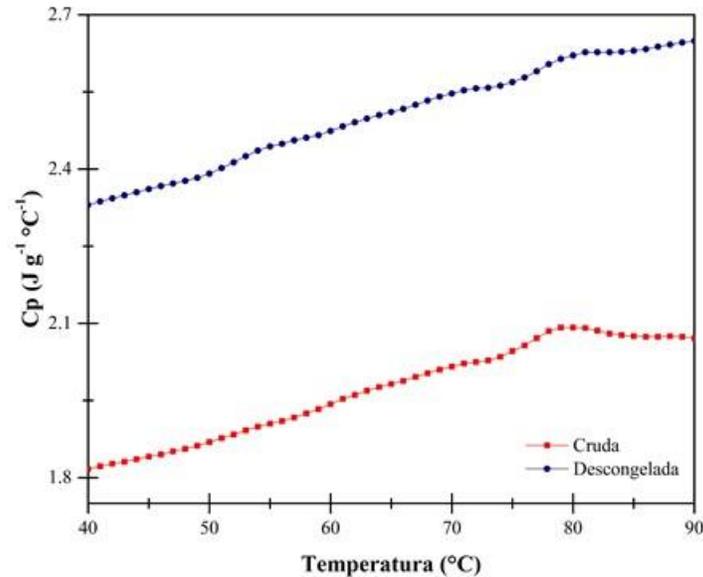
**Cuadro 4:** Temperaturas (inicial y máxima) y entalpías de la carne cruda y descongelada

		<b>Cruda</b>	<b>Descongelada</b>
Miosina	T <sub>o</sub> (°C)	50.09±2.53 <sup>a</sup>	48.12±1.88 <sup>b</sup>
	T <sub>p</sub> (°C)	55.07±1.98 <sup>a</sup>	53.38±2.01 <sup>b</sup>
	ΔH (J g <sup>-1</sup> )	0.16±0.05 <sup>a</sup>	0.26±0.03 <sup>b</sup>
Mioglobina	T <sub>o</sub> (°C)	59.75±1.34 <sup>a</sup>	59.36±1.55 <sup>b</sup>
	T <sub>p</sub> (°C)	65.34±3.43 <sup>a</sup>	64.49±2.26 <sup>b</sup>
	ΔH (J g <sup>-1</sup> )	0.25±0.04 <sup>a</sup>	0.24±0.06 <sup>b</sup>
Actina	T <sub>o</sub> (°C)	73.32±1.12 <sup>a</sup>	72.01±1.01 <sup>ab</sup>
	T <sub>p</sub> (°C)	77.88±1.28 <sup>a</sup>	76.59±1.46 <sup>ab</sup>
	ΔH (J g <sup>-1</sup> )	0.22±0.07 <sup>a</sup>	0.36±0.09 <sup>b</sup>

Media ± desviación estándar.

<sup>ab</sup> Las medias con diferente letra en la misma fila son diferentes ( $P < 0.05$ ).

En el caso de la carne congelada-descongelada, la MMb se encontraba en la más alta proporción (Cuadro 3). Por lo tanto, había una disociación reversible en el grupo *hemo* y la apoproteína, que es más factible en esta forma química de la mioglobina. Por lo que, la T<sub>p</sub> de la mioglobina en la carne descongelada cambia a una temperatura menor y la ΔH disminuye, aunque la mioglobina se encontraba en su mayoría en el estado no oxidado (DMb). Estos resultados sugieren que las moléculas de agua, antes y después de la congelación, contribuyen a la estabilidad conformacional de la molécula de mioglobina<sup>(1)</sup>. En este contexto, Chaijan *et al*<sup>(1)</sup>, Ledward<sup>(37)</sup> y Atanasov y Mitova<sup>(41)</sup> reportaron que el valor de T<sub>p</sub> de la mioglobina cambia a una menor temperatura cuando la formación de la MMb aumenta durante la refrigeración de la carne. Los autores concluyeron que la DMb es la forma más estable frente al calor, seguida por la OMb y la MMb, respectivamente. Los resultados coinciden con los reportados en esta investigación. En los estudios de MDSC, los cambios estructurales en las proteínas se pueden obtener a partir del flujo de calor mediante el valor de Cp, que se calcula de la relación de la amplitud modulada del flujo de calor y la amplitud modulada de la transformada discreta de Fourier<sup>(42)</sup>. Los termogramas para la carne cruda y descongelada se presentan en la Figura 4. Se puede observar que ocurrieron cambios similares en la estructura proteica; sin embargo, estas variaciones fueron solo de magnitud.

**Figura 4:** Calor específico ( $C_p$ ) de la carne cruda y descongelada

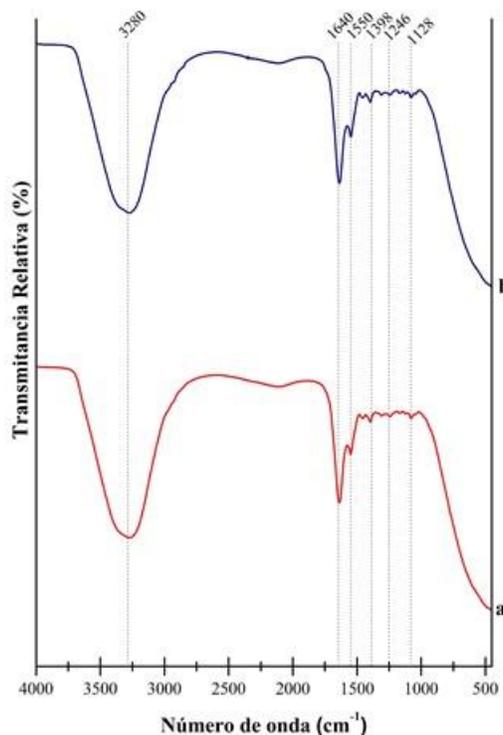
### Energías de activación ( $E_a$ )

Las energías de activación necesarias para la desnaturalización proteica se obtuvieron mediante el análisis MLR. Los valores para el extracto de mioglobina, la carne cruda y las muestras descongeladas fueron  $393.24 \pm 2.14$ ,  $305.71 \pm 3.74$  y  $327.89 \pm 3.05$  kJ mol<sup>-1</sup>, respectivamente. En general, la  $E_a$  mostró variaciones significativas atribuibles a varios factores, incluyendo la concentración de las proteínas desnaturalizadas y no desnaturalizadas, así como la modificación estructural de las proteínas cuando se someten al proceso de congelación. Bajo estas condiciones ocurrieron cambios conformacionales, los cuales desencadenaron una variación en la energía de activación, que también influye en la cantidad de proteínas solubles, como la mioglobina. Además, las variaciones en los valores de la  $E_a$  podrían atribuirse a las reacciones de oxigenación de la mioglobina por el aire, así como a los cambios estructurales que ocurrieron de la DMb a la MMb. Las reacciones redox modifican la estructura de la proteína; generalmente, la MMb requiere más energía y menos temperatura para iniciar el proceso de desnaturalización (Figura 3-a y 4). Aunque la MMb es menos termoestable; por lo que, se requiere más energía para desencadenar modificaciones conformacionales.

## Espectroscopia FTIR-ATR

La Figura 5 muestra los espectros FTIR-ATR, los cuales se colectaron en el intervalo de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . La banda característica alrededor de los 3,280  $\text{cm}^{-1}$  está asociada con las vibraciones de estiramiento de las moléculas de agua ( $\text{OH}^-$ ) y la vibración del NH en las amidas secundarias. La información sobre los cambios bioquímicos que ocurren durante el proceso de congelación-descongelación se proporciona en el intervalo de 1,750-1,000  $\text{cm}^{-1}$ <sup>(43)</sup>. La banda a 1,640  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de amidas primarias en la estructura molecular de la  $\alpha$ -hélice en la DMb. La banda a 1,550  $\text{cm}^{-1}$  fue asignada a las vibraciones en las amidas secundarias (estiramiento entre CN) de la molécula de mioglobina. Esta banda única parece ser más fuerte en la carne descongelada que en la carne cruda, lo que indica una mayor cantidad de grupos amida. Además, se observó un modo de vibración de estiramiento de amidas C-N a 1,398  $\text{cm}^{-1}$ . A 1,311 y 1,246  $\text{cm}^{-1}$  hubo estiramiento C-N en las aminas, principalmente de la mioglobina y proteínas miofibrilares, y a 1,165 y 1,128  $\text{cm}^{-1}$  se presentaron vibraciones de aminas, aminoácidos y estiramiento C-N. Estas bandas fueron más intensas después de los procesos de congelación-descongelación debido a la existencia de moléculas de agua. Finalmente, hubo cambios importantes entre la región de 1,292-1,371  $\text{cm}^{-1}$ , que pertenece a las aminas y amidas terciarias de proteínas solubles<sup>(44,45)</sup>.

**Figura 5:** Espectro FTIR-ATR de (a) carne cruda, (b) carne descongelada



## Conclusiones e implicaciones

El proceso de congelación-descongelación tiene efectos significativos en la forma de la mioglobina, estos a su vez producen importantes cambios en la termodinámica, las energías de activación y los grupos funcionales, todos asociados con cambios en el color de la carne.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la UNAM el apoyo económico para esta investigación a través de los proyectos PAPIIT IT201417 y PIAPI 1806 y 1820. Jonathan Coria-Hernández también agradece al CONACYT por la beca para estudios de Doctorado (447128).

## Literatura citada:

1. Chaijan M, Benjakul S, Visessanguan W, Faustman C. Characterization of myoglobin from sardine (*Sardinella gibbosa*) dark muscle. *Food Chem* 2007;100:156-164.
2. Kerth CR. *The science of meat quality*. USA: Wiley – Blackwell Ed.; 2013.
3. Zhou GH, Xu XL, Liu Y. Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Sci* 2010;86:119-128.
4. AMSA. *Meat color measurement guidelines*. USA: American Meat Science Association. 2012.
5. Berk Z. *Food process engineering and technology*. 2nd ed. United Kingdom: Elsevier; 2013.
6. Meléndez PR, Arjona RJL, Velázquez CRR, Méndez AA, Vázquez DA. On the thermal properties of frozen, refrozen and freeze drying porcine *Longissimus dorsi*. *J Anim Vet Adv* 2011;10(22):2956-2960.
7. Mancini RA, Hunt MC. Current research in meat color. *Meat Sci* 2005;71:100-121.
8. Warris PD. The extraction of ham pigments from fresh meat. *J Food Technol* 1979;14:75-80.

9. AOAC. Official methods of analysis 17th. ed. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists. 2000.
10. Koniecko ES. Handbook for Meat Chemists. USA: Avery Publishing Group Inc. Wayne; 1979.
11. Coria HJ, Meléndez PR, Rosas MME, Llorente BA, Arjona RJL. Analysis of the color profile and shear force in ultrasonicated pork meat (*Longissimus thoracis*). Arctic J 2017;70(7):16-30.
12. Porras BLD, González HMI, Ochoa GOA, Sotelo DLI, Camelo MGA, Quintanilla CMX. Colorimetric image analysis as a factor in assessing the quality of pork ham slices during storage. Rev Mex Ing Quím 2015;14(2):243-252.
13. Tapp WN, Yancey JWS, Apple JK. How is the instrumental color of meat measured? Meat Sci 2011;89:1-5.
14. Yancey JWS, Kropf DH. Instrumental reflectance values of fresh pork are dependent on aperture size. Meat Sci 2008;79:734-739.
15. Tang J, Faustman C, Hoagland TA. Krzywicki revisited: Equations for spectrophotometric determination of myoglobin redox forms in aqueous meat extracts. J Food Sci 2004;69(9):717-720.
16. Agama AE, Bello PLA, Pacheco VG, Evangelista LS. Inner structure of plantain starch granules by surface chemical gelatinization: Morphological, physicochemical and molecular properties. Rev Mex Ing Quím 2015;14(1):73-80.
17. Coria HJ, Meléndez PR, Rosas MME, Llorente BA, Arjona RJL. Activation energy for protein denaturation in frozen and freeze-dried pork meat (*Longissimus thoracis*) by MDSC. Interciencia J 2017;47(7):22-32.
18. Zamudio FPB, Tirado GJM, Monter MJG, Aparicio SA, Torruco U, Salgado DR, Bello PLA. *In vitro* digestibility and thermal, morphological and functional properties of flours and oat starches of different varieties. Rev Mex Ing Quím 2015;14(1):81-97.
19. Calzetta AR, Suarez C. Gelatinization kinetics of amaranth starch. Int J Food Sci Technol 2001;36:441-448.
20. Cornillon P. Characterization of osmotic dehydrated Apple by NMR and DSC. LWT Food Sci Technol 2000;33:261-267.
21. Coria HJ, Méndez AA, Meléndez PR, Rosas MME, Arjona RJL. Thermal, structural, and rheological characterization of waxy starch as a cryogel for its application in food processing. Polymers 2018;10(359):1-13.

22. Karamucki T, Jakubowska M, Rybarczyk A, Gardzielewska J. The influence of myoglobin on the colour of minced pork loin. *Meat Sci* 2013;94:234-238.
23. Brewer MS, Zhu LG, Bidner B, Meisinger DJ, McKeith FK. Measuring pork color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. *Meat Sci* 2001;57:169-176.
24. Honikel KO. pH measurement. *Encyclopedia of Meat Sciences*, Vol. 1. United Kingdom: Elsevier; 2014.
25. Krzywicki K. Assesment of relative content of myoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin at the surface of beef. *Meat Sci* 1979;3:1-10.
26. Irie M, Swatland HJ. Relationships between Japanese pork color standards and optical properties of pork before and after frozen storage. *Food Res Int* 1992;25:21-30.
27. Lesiów T, Xiong YL. A simple, reliable and reproductive method to obtain experimental pale, soft and exudative (PSE) pork. *Meat Sci* 2013;93:489-494.
28. Lindahl G, Karlsson AH, Lundström K, Andersen HJ. Significance of storage time on degree of blooming and colour stability of pork loin from different crossbreeds. *Meat Sci* 2006;72:603-612.
29. Lindahl G, Lundström K, Tornberg E. Contribution of pigment content, myoglobin forms and internal reflectance to the colour of pork loin and ham from pure breed pigs. *Meat Sci* 2001;59:141-151.
30. Skrlep M, Candek-Potokar M. Pork color measurement as affected by bloom time and measurement location. *J Muscle Foods* 2006;18:78-87.
31. Gap-Don K, Eun-Young J, Hyun-Jung L, Han-Sul Y, Seon-Tea J, Jin-Yeon J. Influence of meat exudates on the quality characteristics of fresh and freeze-thawed pork. *Meat Sci* 2013;95:323-329.
32. Kasaa MR. Use of water properties in food technology: A global view. *Int J Food Prop* 2014;17:1034-1054.
33. Chmiel M, Słowiński M, Dasiewicz K. Lightness of the color measured by computer image analysis as a factor for assessing the quality of pork meat. *Meat Sci* 2011;88:566-580.
34. Swatland HJ. Spectrophotometry of beef muscle and adipose tissue during heating and cooling. *J Muscle Foods* 1997;8(1):1-12.

35. Cho KC, Choy CL. Thermal stability of hemoglobyn and myoglobin. *Biochim Biophys Acta* 1980;622:320-330.
36. Doster W, Bachleitner A, Dunau R, Hiebl M, Lüscher E. Thermal properties of water in myoglobin crystals and solutions at subzero temperatures. *Biophys J* 1986;50:213-219.
37. Ledward DA. Scanning calorimetric studies of some protein-protein interactions involving myoglobin. *Meat Sci* 1978;2:241-249.
38. Privalov PL, Griko YV, Venyaminov SY. Cold denaturation of myoglobin. *J Mol Biol* 1986;190:487-498.
39. Dina JB, Barón PJ, Zaritzky NE. Mathematical modeling of the heat transfer process and protein denaturation during the thermal treatment of Patagonian marine crabs. *J Food Eng* 2012;113:623-634.
40. Kazemi S, Ngadi OM, Gariépy C. Protein denaturation in pork *Longissimus* muscle of a different quality groups. *Food Bioprocess Technol* 2011;4:102-106.
41. Atanasov BP, Mitova SV. Thermal denaturation of *Delphinus delphis* ferromyoglobin derivates in alkaline pH regions. *Biochim Biophys Acta* 1971;243:457-466.
42. Verdonck E, Schaap K, Thomas LC. A discussion of the principles and applications of Modulated Temperature DSC (MTDSC). *Int J Pharm* 1997;192:3-20.
43. Wang Y, Boysen RI, Wood BR, Kansiz M, McNaughton D, Hearn MTW. Determination of the secondary structure of proteins in different environments by FTIR-ATR spectroscopy and PLS regression. *Byopolymers* 2008;89(11):895-905.
44. Prieto N, Roehe R, Lavín P, Batten G, Andrés S. Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Sci* 2009;83:175-186.
45. Uddin M, Okazaki E, Ahmad MU, Fukuda Y, Tanaka M. NIR spectroscopy: A non-destructive fast technique to verify heat treatment of fish-meat gel. *Food Control* 2006;17:660-664.